

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-139496

(P2001-139496A)

(43) 公開日 平成13年5月22日 (2001.5.22)

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	ページ-1 (参考)
A 6 1 K 48/00		A 6 1 K 48/00	4 B 0 2 4
A 0 1 K 67/027		A 0 1 K 67/027	4 B 0 6 5
A 6 1 K 39/00		A 6 1 K 39/00	H 4 C 0 8 4
A 6 1 P 37/00		A 6 1 P 37/00	4 C 0 8 5
C 1 2 N 5/10		C 1 2 N 7/00	4 C 0 8 7

審査請求 未請求 請求項の数19 O L (全 8 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特開平11-324771

(22) 出願日 平成11年11月15日 (1999.11.15)

(71) 出願人 388020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番6号

(72) 発明者

高橋 祥介

徳島県徳島市国府町甲戸字北原敷45-1

(74) 代理人 100107984

弁理士 廣田 雅紀

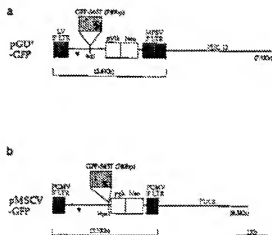
最終頁に続く

(54) 発明の名称 後天的免疫寛容の獲得方法

(57) 要約

【課題】 外来遺伝子が組み込まれたベクター等の外来性DNAやその発現産物を「非自己」ではなく「自己」として認識させることができる、外来性DNAやその発現産物に対する後天的免疫寛容の獲得方法や、外来遺伝子が組み込まれたベクター等の外来性DNAやその発現産物に対する後天的免疫寛容に対する拒絶応答を回避することができる遺伝子治療効果の持続方法や、外来遺伝子が組み込まれたベクター等の外来性DNAやその発現産物に対する後天的免疫寛容を獲得した非ヒト動物を提供すること。

【解決手段】 外来遺伝子が組み込まれたウイルスベクター等の外来性DNAが導入された幼若Tリンパ球を飼育して、飼育装置内で前記外来性DNAを発現させる。上記外来性DNAを幼若Tリンパ球に導入する方法としては、例えば、幼若Tリンパ球とウイルスベクター-感染ウイルスプロフェーザー細胞とを共培養する方法を挙げることができる。



(2)

特開2001-129496

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 幼若トリリンパ球を介して胸腺へ外来性DNAを導入することを特徴とする外来性DNA及び/又はその発現産物に対する後天的免疫寛容の獲得方法。

【請求項2】 外来性DNAが導入された幼若トリリンパ球を胸腺に移入して、胸腺器官内で前記外来性DNAを発現させることを特徴とする請求項1記載の外来性DNA及び/又はその発現産物に対する後天的免疫寛容の獲得方法。

【請求項3】 外来性DNAが、少なくともアレルギー性疾患誘発物質又は自己免疫性疾患誘発物質をコードする遺伝子を含むDNAであることを特徴とする請求項1又は2記載の外来性DNA及び/又はその発現産物に対する後天的免疫寛容の獲得方法。

【請求項4】 外来性DNAが、少なくともペプチド性治療薬をコードする遺伝子を含むDNAであることを特徴とする請求項1又は2記載の外来性DNA及び/又はその発現産物に対する後天的免疫寛容の獲得方法。

【請求項5】 外来性DNAが、少なくともベクターを含むDNAであることを特徴とする請求項1〜4のいずれか記載の外来性DNA及び/又はその発現産物に対する後天的免疫寛容の獲得方法。

【請求項6】 ベクターが外来遺伝子導入用ウイルスベクターであることを特徴とする請求項5記載の外来性DNA及び/又はその発現産物に対する後天的免疫寛容の獲得方法。

【請求項7】 ウイルスベクターが、レトロウイルス、アデノウイルス又はレンチウイルスに由来するベクターであることを特徴とする請求項6記載の外来性DNA及び/又はその発現産物に対する後天的免疫寛容の獲得方法。

【請求項8】 遺伝子治療における外来性DNAを幼若トリリンパ球を介して胸腺へ導入することを特徴とする遺伝子治療効果の持続方法。

【請求項9】 遺伝子治療における外来性DNAが導入された幼若トリリンパ球を胸腺に移入して、胸腺器官内で外来性DNAを発現させることにより、外来性DNA及び/又はその発現産物により惹起される免疫応答を回避することを特徴とする請求項8記載の遺伝子治療効果の持続方法。

【請求項10】 外来性DNAが、少なくともベクターを含むDNAであることを特徴とする請求項8又は9のいずれか記載の遺伝子治療効果の持続方法。

【請求項11】 ベクターが外来遺伝子導入用ウイルスベクターであることを特徴とする請求項10記載の遺伝子治療効果の持続方法。

【請求項12】 ウイルスベクターが、レトロウイルス、アデノウイルス又はレンチウイルスに由来するベクターであることを特徴とする請求項11記載の遺伝子治療効果の持続方法。

2

【請求項13】 幼若トリリンパ球を介して胸腺へ外来性DNAを導入することを特徴とする外来性DNA及び/又はその発現産物に対する後天的免疫寛容を獲得した非ヒト動物。

【請求項14】 外来性DNAが導入された幼若トリリンパ球を胸腺に移入して、胸腺器官内で前記外来性DNAを発現させることを特徴とする請求項13記載の外来性DNA及び/又はその発現産物に対する後天的免疫寛容を獲得した非ヒト動物。

【請求項15】 外来性DNAが、少なくともベクターを含むDNAであることを特徴とする請求項13又は14記載の外来性DNA及び/又はその発現産物に対する後天的免疫寛容を獲得した非ヒト動物。

【請求項16】 ベクターが外来遺伝子導入用ウイルスベクターであることを特徴とする請求項15記載の外来性DNA及び/又はその発現産物に対する後天的免疫寛容を獲得した非ヒト動物。

【請求項17】 ウイルスベクターが、レトロウイルス、アデノウイルス又はレンチウイルスに由来するベクターであることを特徴とする請求項16記載の外来性DNA及び/又はその発現産物に対する後天的免疫寛容を獲得した非ヒト動物。

【請求項18】 非ヒト動物が霊長類に属する非ヒト動物であることを特徴とする請求項13〜17のいずれか記載の外来性DNA及び/又はその発現産物に対する後天的免疫寛容を獲得した非ヒト動物。

【請求項19】 霊長類に属する非ヒト動物がマウスであることを特徴とする請求項18記載の外来性DNA及び/又はその発現産物に対する後天的免疫寛容を獲得した非ヒト動物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、幼若トリリンパ球を介する胸腺へのDNA導入による、ウイルスベクター由来成分等の外来性DNA及び/又はその発現産物に対する後天的免疫寛容の獲得方法や、遺伝子治療における外来性DNA及び/又はその発現産物に対する拒絶応答を回避する遺伝子治療効果の持続方法や、ウイルスベクター由来成分等の外来性DNA及び/又はその発現産物に対して後天的免疫寛容を獲得したマウス等の非ヒト動物に関する。

【0002】

【従来の技術】生体は一般に自己を構成する抗原に対しては免疫応答を示さない。これは自然な免疫寛容と呼ばれている。一方、本来異種の抗原であっても投与の時期（特に胎生期ないし新生期）、投与の方法（たとえば免疫抑制剤を用いるとか）、投与するときの性状（タンパク質抗原なら毒性を除いて投与する）によれば、その後の免疫応答に対して反応性を示さない状態を誘導できる。これは、後天的な免疫寛容と呼

50

ばれている。また、免疫応答とは、一般に自己と自己以外のもの（非自己）とを識別し、非自己に対して細胞性や体液性の反応を惹起したものと捉えられている。この識別は、リンパ球表面にある抗原受容体によって行われ、非自己と認識した場合には、リンパ球が増殖して細胞毒性を発揮する抗体を産生するようになる。しかし、リンパ球による認識の最初の段階では、まず、樹状細胞やマクロファージが異物（非自己）を取込み、リンパ球によって認識される形で提示するという段階が必要なので、自己と非自己の認識は樹状細胞やマクロファージとリンパ球との相互作用のレベルで行われているとも考えられている。

【0003】一方、組織系DNA等の実験により得られた外来遺伝子を患者の体細胞に導入して、その遺伝子の機能により該患者の遺伝子疾患を治療する遺伝子治療は、癌、免疫不全、心血管疾患等の多くの遺伝子疾患に適用されつつある。しかし、遺伝子治療を阻んでいる最も大きな原因は、遺伝子を導入する際に用いるベクター（遺伝子導入のための運び屋）成分に対する上記免疫応答である。すなわち、細胞に遺伝子を導入することそのものは技術的に完成しつつあるが、遺伝子導入の途には必ず何らかのベクターを用いなければならない。また、このベクターの遺伝子導入方法としては、レトロウイルス・アデノウイルス・レンチウイルス等いろいろなウイルスを用いるウイルスベクター法や、DNAを包み込んだ膜を細胞と融合させるリポソーム法や、直接遺伝子を導入するマイクロインジェクション法や、挿入DNAのサイズが制限されずかつ細胞毒性が高いというセンダイウイルス（HVJ）法（J. Biol. Chem. 264, 12123-12129, 1989; J. Biol. Chem. 266, 3361-3364, 1991; Bioche. Biophys. Res. Commun. 186, 129-134, 1992; Circ. Res. 73, 898-905, 1993; Science 243, 375-378, 1989; J. Clin. Invest. 94, 978-984, 1994）等が知られている。

【0004】上記のいずれの遺伝子導入方法においても、導入するベクターは我々の身体にとっては異物であるために、これらベクターの成分に対する免疫応答が惹起され、その結果、早晩のうちに（通常2週間から1ヶ月のうちに）在体ベクターを排除してしまう。例えばウイルスベクターの場合、ベクター成分が細胞膜表面でタンパク質として発現し、そのタンパク質が細胞表面のペプチドとして発現され、リンパ球がベクター由来のペプチドを認識して感染細胞を殺し、ベクター（ウイルス）を排除してしまう。このように、現在遺伝子治療においては、遺伝子導入のものには成功しても、発現の特異性効果を得ることに再現よく成功していない欠点があった。

【0005】また従来、後天的免疫寛容の獲得方法に關して、脂溶性成分又は脂溶性成分含有物質を抗原と同時に接種させることにより哺乳動物に対して免疫寛容

を誘導する方法（特開平9-194383号公報）や、経口投与によって実質的に免疫寛容を奏さず、注射によって薬理的効果を奏し、かつ注射による繰り返し投与によって免疫寛容が獲得されなくなる薬物は有効成分とする医薬製剤であって、経口免疫寛容を誘導するのに十分な投与単位量の該薬物含有経口投与用製剤と、経口免疫寛容が誘導された後に投与するための該薬物含有注射用製剤とからなる医薬製剤を用いる方法（特開平1-629810号公報）や、移植受入れ患者に対応した特異的な免疫寛容を得た動物から臓器を摘出することにより、移植された臓器のリンパ球などから構成される末梢性免疫機構が、移植された後との組織適合反応を攻撃せず、良好な臓器生着を有する人工臓器を用いて移植患者に免疫寛容を成立させる方法（特開平9-187470号公報）が知られている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】FTOC（幼若樹状細胞増殖）においてレトロウイルスを介して遺伝子を直接導入する方法やリンパ球増殖におけるMAPキナーゼの発現に関する情報（Cell 56, 243-251, 1996）されており、従来も胸腺に遺伝子を導入しようとする試みがあったが、正常の実験動物においても免疫効果が悪く、気管のTリンパ球による排除作用を助長する効果に乏しく、そのため実用性に乏しかった（FASER, J. G, 2853-2858, 1992; Ann. Surg. 222, 229-242, 1995; J. Clin. Invest. 98, 2540-2547, 1996）。

【0007】本発明者らは、遺伝子治療を受けさせる個体のモデル動物として、マウスを用いて、グリーン蛍光蛋白質（GFP）遺伝子とレトロウイルスベクター（pGD）とを融合させたpGD-GFPを皮下や腹腔内に注入したところ、かかるマウスがベクター成分に対して免疫応答を示し、GFP遺伝子が組み込まれたウイルスベクターを2週間から1ヶ月のうちに体内から消失していたが、Tリンパ球を欠損した免疫不全マウスを用いて同様に実験を行ったところ、かかる免疫応答が概らなかった。この原因はTリンパ球を介した細胞性免疫応答、すなわちTリンパ球が遺伝子疾患の治療に有用なベクター遺伝子やその発現産物を非自己として認識し排除しているものと考えられた。

【0008】本発明の課題は、上記のように遺伝子治療等の有用な外来遺伝子が組み込まれたベクター等の外来性DNAやその発現産物を「非自己」ではなく「自己」として認識させることができる、外来遺伝子が組み込まれたベクター等の外来性DNAやその発現産物に対する後天的免疫寛容の獲得方法や、外来遺伝子が組み込まれたベクター等の外来性DNAやその発現産物に対する免疫寛容を誘導することができる遺伝子治療効果の発現方法や、外来遺伝子が組み込まれたベクター等の外来性DNAやその発現産物に対する後天的免疫寛容を獲得した非ヒト動物を提供することにある。

(4)

特開 2001-139496

5

6

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者は、生体のTリンパ球が遠隔子導入用ウイルスベクターの成分を「非自己」ではなく「自己」として認識するように、生体のTリンパ球系を再教育し、かかる導入遠隔子ベクターに対する免疫応答を回避させる方法を鋭意研究した結果、本発明者の胸腺での幼若Tリンパ球への遠隔子導入にpGD-GFP遺伝子を導入し、かかる遠隔子導入細胞をGFPの発現による蛍光染色を均用して精製し、正常のマウスのTリンパ球を一過性に抑制するため低線量の放射線を照射し、遠隔子導入幼若Tリンパ球を胸腺に移入し、このマウスの放射線照射からの回復を持つてから、pGD-GFPレトロウイルスを皮内や腹腔内に注射したところ、幼若Tリンパ球前処理の効果で、マウス内で導入遠隔子GFPの発現は長期間にわたり持続していた。すなわち、抗ベクター免疫応答を回避させることができ、持続的な遠隔子治療が可能になることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0010】またこのとき、ベクター成分以外の外来分子に対する免疫応答は正常に保たれており、マウスの免疫系全体が傷害を受けたわけではなく、遠隔子治療のベクターに対しての特異的免疫応答が誘導されたことや、他の臓器で遠隔子導入に用いるベクターをそのまま幼若Tリンパ球に移植させることは問題なく可能であることがわかった。この方法を用いることによって、自己・非自己の識別をもたらす中心臓器である胸腺に、幼若Tリンパ球を介して効率よく遠隔子を導入することができ、胸腺気管内でのベクター成分の効率のよい発現と、それによる幼若のよいTリンパ球の自己免疫の成立がもたらされることがわかった。

【0011】すなわち本発明は、幼若Tリンパ球を介して胸腺へ外来性DNAを導入することを特徴とする外来性DNA及び/又はその発現産物に対する後天的免疫寛容の獲得方法（請求項1）や、外来性DNAが導入された幼若Tリンパ球を胸腺に移入して、胸腺器官内で前記外来性DNAを発現させることを特徴とする請求項1記載の外来性DNA及び/又はその発現産物に対する後天的免疫寛容の獲得方法（請求項2）や、外来性DNAが、少なくともアレルギー性疾患惹起物質又は自己免疫疾患惹起物質をコードする遠隔子を含むDNAであることと特徴とする請求項1又は2記載の外来性DNA及び/又はその発現産物に対する後天的免疫寛容の獲得方法（請求項3）や、外来性DNAが、少なくともベクター性治療をコードする遠隔子を含むDNAであることを特徴とする請求項1又は2記載の外来性DNA及び/又はその発現産物に対する後天的免疫寛容の獲得方法（請求項4）や、外来性DNAが、少なくともベクターを含むDNAであることを特徴とする請求項1〜4のい

ずれか記載の外来性DNA及び/又はその発現産物に対する後天的免疫寛容の獲得方法（請求項5）や、ベクターが外来遠隔子導入用ウイルスベクターであることを特徴とする請求項5記載の外来性DNA及び/又はその発現産物に対する後天的免疫寛容の獲得方法（請求項6）や、ウイルスベクターが、レトロウイルス、アデノウイルス又はレンチウイルスに由来するベクターであることを特徴とする請求項6記載の外来性DNA及び/又はその発現産物に対する後天的免疫寛容の獲得方法（請求項7）に関する。

【0012】また本発明は、遠隔子治療における外来性DNAを幼若Tリンパ球を介して胸腺へ導入することを特徴とする遠隔子治療効果の持続方法（請求項8）や、遠隔子治療における外来性DNAが導入された幼若Tリンパ球を胸腺に移入して、胸腺器官内で外来性DNAを発現させることにより、外来性DNA及び/又はその発現産物により惹起される免疫応答を回避することを特徴とする請求項8記載の遠隔子治療効果の持続方法（請求項9）や、外来性DNAが、少なくともベクターを含むDNAであることを特徴とする請求項8又は9のいずれか記載の遠隔子治療効果の持続方法（請求項10）や、ベクターが外来遠隔子導入用ウイルスベクターであることを特徴とする請求項10記載の遠隔子治療効果の持続方法（請求項11）や、ウイルスベクターが、レトロウイルス、アデノウイルス又はレンチウイルスに由来するベクターであることを特徴とする請求項11記載の遠隔子治療効果の持続方法（請求項12）に関する。

【0013】さらに本発明は、幼若Tリンパ球を介して胸腺へ外来性DNAを導入することを特徴とする外来性DNA及び/又はその発現産物に対する後天的免疫寛容を獲得した非ヒト動物（請求項13）や、外来性DNAが導入された幼若Tリンパ球を胸腺に移入して、胸腺器官内で前記外来性DNAを発現させることを特徴とする請求項13記載の外来性DNA及び/又はその発現産物に対する後天的免疫寛容を獲得した非ヒト動物（請求項14）や、外来性DNAが、少なくともベクターを含むDNAであることを特徴とする請求項13又は14記載の外来性DNA及び/又はその発現産物に対する後天的免疫寛容を獲得した非ヒト動物（請求項15）や、ベクターが外来遠隔子導入用ウイルスベクターであることを特徴とする請求項15記載の外来性DNA及び/又はその発現産物に対する後天的免疫寛容を獲得した非ヒト動物（請求項16）や、ウイルスベクターが、レトロウイルス、アデノウイルス又はレンチウイルスに由来するベクターであることを特徴とする請求項16記載の外来性DNA及び/又はその発現産物に対する後天的免疫寛容を獲得した非ヒト動物（請求項17）や、非ヒト動物が器官腫瘍に属する非ヒト動物であることを特徴とする請求項13〜17のいずれか記載の外来性DNA及び/又はその発現産物に対する後天的免疫寛容を獲得した非ヒト

50

(5)

特開2001-135495

8

動物(請求項18)や、霊長類に属する非ヒト動物がマウスであることを特徴とする請求項18記載の外來性DNA及び/又はその発現産物に対する後天的免疫寛容を獲得した非ヒト動物(請求項19)に関する。

【0014】

【発明の実施の形態】本発明の外來性DNA及び/又はその発現産物に対する後天的免疫寛容の獲得方法は、倘若リンパ球を介して胸腺へ外來性DNAを導入することを特徴とし、詳しくは、外來性DNAが導入された幼若リンパ球を胸腺に導入して、胸腺腔内で前記外來性DNAを発現させることを特徴とする。

【0015】本発明において外來性DNAとは、後天的免疫寛容を獲得しようとする動物に元来存在しないDNAをいい、その複製産物が該動物にとって非自己として認識されるDNAをいう。また、本発明において外來遺伝子とは、後天的免疫寛容を獲得しようとする動物に元来存在しない遺伝子をいい、その複製産物が該動物にとって非自己として認識される遺伝子をいう。そして、前記外來性DNAとしては、外來遺伝子やベクターや目的遺伝子が組み込まれたベクター等を具体的に挙げることができ、外來遺伝子としては、例えば、少なくともアレル性抗原提示基質や自己免疫性疾患抗原物質、特に深刻なアレル性抗原提示基質や慢性関節リウマチの疾患関連物質であるMBP(ミエリン塩基性タンパク質)分子等の自己免疫性疾患基質をコードする遺伝子等や、少なくともベクター性抗腫瘍やベクター性癌原病治療等をコードする遺伝子等を挙げることができ、また、ベクターとしては、前記外來遺伝子の導入用等のウイルスベクター、プラスミドベクター、ファージベクター、酵母人工染色体(YAC)ベクター等のベクターを例示することができるが、ウイルス粒子として感染させた場合に形質転換効率が非常に高い点でウイルスベクター、特にレトロウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス等に由来するウイルスベクターを用いることが好ましい。これらウイルスベクターを用いる場合、該ウイルスベクターを予め宿主細胞に感染させ、ウイルスプロデューサー細胞として用いることが好ましい。

【0016】本発明において用いられる幼若リンパ球とは、抗原受容体及び補助的コレセプターCD4/CD8などを発現する成熟リンパ球になる前のリンパ球をいい、例えば、成熟胸腺リンパ球から分離・精製することにより、また胎生14～18日頃の胸腺臓から得ることができる。胎生14～15日頃の胸腺臓は、左右両葉が個別に心臓上方に存在し、透明感のある球状で周辺組織とは区別しやすい成熟リンパ球の導入にいい点で、この時期の胸腺臓を用いることが好ましい。

【0017】本発明における外來性DNAを幼若リンパ球へ導入する方法としては、本発明者らが開示した遺伝子導入テクニック(参. Immunol. 101, 2866-2894, 1998, Immun. 95, 565-574, 1995)、例えば、幼若Tリ

ンパ球とウイルスプロデューサー細胞を共培養し、ウイルスプロデューサー細胞よりも大きさが小さく、感染能が低いことを利用して、遺伝子が導入された幼若リンパ球をフォワード・サイド・スクランブル(forward and side scatter)により分離し、蛍光活性化セルソーターにより、生存能力のある幼若リンパ球を分離・精製する方法や、造血細胞マーカーCD45に対する抗体を染色したものを使用して、フローサイトメトリー・セルソーターでGFP⁺CD45⁺細胞をソートすることにより遺伝子が導入された幼若リンパ球を、繊維芽細胞由来のウイルスプロデューサー細胞から識別して分離・精製する方法を用いることが、リンパ球の教育基質である胸腺腔内で、外來性DNA導入細胞を分化・成熟させることができる点で好ましい。

【0018】本発明の外來性DNAの発現産物に対する後天的免疫寛容は、例えば、上記方法により得られた幼若リンパ球に前記遺伝子等の目的遺伝子が組み込まれたベクターを導入し、かかるベクターが導入された幼若リンパ球を、胸腺への直接注射や、経静脈注射することにより胸腺に移入させ、胸腺腔内でかかる外來性DNAを発現させることにより獲得することができる。その際、外來性DNAにより惹起される免疫応答も同時に阻害することができる。

【0019】本発明における遺伝子治療効果の持続方法は、遺伝子治療における外來性DNAを幼若リンパ球を介して胸腺へ導入することを特徴とし、毎に遺伝子治療における外來性DNAが導入された幼若リンパ球を胸腺に移入して、胸腺腔内で外來性DNAを発現させることにより、外來性DNA及び/又はその発現産物により惹起される免疫応答を例えば1ヶ月以上の長期間にわたって阻害することを特徴とするものであり、遺伝子治療効果の持続は、前記外來性DNA及び/又はその発現産物に対する後天的免疫寛容の獲得方法における外來性DNAとして、遺伝子治療に有用な外來性DNAを用いる場合に達成することができる。

【0020】本発明における外來性DNA及び/又はその発現産物に対する後天的免疫寛容を獲得した非ヒト動物は、幼若リンパ球を介して胸腺へ外來性DNAを導入することを特徴とし、特に外來性DNAが導入された幼若リンパ球を胸腺に移入して、胸腺腔内で前記外來性DNAを発現させることを特徴とする。かかる非ヒト動物としては、非ヒト哺乳動物、例えばマウス、ラット、ウサギ等の哺乳動物を例示することができるが、育成、使用の簡便さ等からしてマウスが好ましい。以下、本発明を、非ヒト動物がマウスの場合を例に示した実施例を挙げて更に具体的に説明するが、この発明の技術的範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0021】

【実施例】実施例1(癌治療の模範)

RPMI1640[最終濃度で、50μMの2-メルカ

ブエタノール (シグマケミカル社製)、1.0 mMのヘ
ベス (Gibco BRL社製)、2 mMのL-グルタミン (Gib
co BRL社製)、1 × 非必須アミノ酸 (Gibco BRL社
製)、1 mMのビリン酸ナトリウム (Gibco BRL社
製)、1.0 U/mlのペニシリン (Gibco BRL社
製)、1.0 U/g/mlのストレプトマイシン (Gibco
社製) を含む培地に、5.6 °Cで30分間前処理を
した10%のウシ胎児血清 (FCS) を添加した培養液
(10% FCS-RPMI 1640培地) を調製した。
なお、実施例における操作はすべてクリーンフード内で
無菌的に行った。

【0022】実施例2 (マウス胎仔胸腺葉の採取)
妊娠日15～16日目のマウスを断頭術断尾により殺し、
70%のエタノールでマウスの腹腔を洗浄した後、
胎仔を子宮ごと1.0 U/ml無菌水に取り出した。この子
宮から胎仔を取り出して、実施例1の培地2.0～3.0 ml
の入った100 mm無菌皿に胎仔を移し、2～3回静
かに皿を回転させ洗浄して血液とその余の充満物を取り
除いた。かいるマウス胎仔を無菌皿下に置き、針で胸
腔を切開して2つの胸腺葉を取り出し、ガーゼの上に置
き血液を取り除き、マウス胎仔胸腺葉を採取した。

【0023】実施例3 (培養ウェルの調製)
殺菌したヘリスダット (Helistat) スポンジ (Dalla-Te
co, Inc., Plainsboro, NJ 08536) の小片を24ウェルプ
レート (直径16 mm、組織) の培養ウェルに置き、実
施例1の培地1 mlを入れ、スポンジのなめらかな面を
上に向け、無菌ポリカーボネートフィルター膜 (Costar
, Nucleopore Corp. PC membrane, #10460、直径11
8 mm) をその上に置き、フィルター膜を鑷子で裏返し
て、フィルター膜の両面を培地で完全に浸した後、そ
から0.5 mlの培地をウェルから静かに抜き取り、最
終の培地を1ウェル当たり0.5 mlに調整した。

【0024】実施例4 (マウス胸腺葉の組織培養)
実施例2で得られた4～6葉の胸腺葉を、実施例3で調
製した培養ウェルのスポンジ上のフィルター膜に設置
し、胸腺葉が培地液に浸漬しない状態で、CO₂インキ
ュベーター中にて培養した。

【0025】実施例5 (胎仔胸腺組織培養後の単細胞再
液調製)
2.0 mm皿の培養槽の中心に、1.0 U/mlの染色緩液調
製液 (D、2%のウシ血清アルブミン (BSA) と0.1%
のNa₂N₂を含むpH 7.2のリン酸緩衝生理食塩水
(PBS)) を滴下し、その中に実施例4で組織培養し
た胸腺葉を移し、7型顕微鏡を用いて胸腺葉の数をカウ
ントした。次に小さいナイロンメッシュ (およそ5 mm
m) を培養皿から移された培養液の上に載せ、針先の血
がった26ゲージ針 (先端から5 mm、90度の角径)
と1 mlシリンジを用いて、これらをナイロンメッシュ
に押しつけながら胸腺葉をそとに引き、得られた単細胞
母液をシリンジ内のプラスチックチューブに移し、細

胞の数をカウントして所定濃度の細胞懸液を調製し
た。
【0026】実施例6 (ウイルスプロデュサー細胞の
作製)
GFP遺伝子から調製したS65 T変異体をコードする
740 bpのDNA (クローンテック社製) をpCD'
のBcl Iサイト (図1 a) 又はMCS CVのHpa I
サイト (図1 b) にクローニングした。このクローニ
ングにより得られた組み換えベクターをGP+E-86細
胞にトランスフェクションした。G418耐性細胞の中
から、FACSバンテージセルソーター (Becton Dick
inson社製) を用いてGFP⁺ クローンを分離した。分
離されたクローンから得られた適当な倍率のN1
H-S T3 (ATCC CRL-1658) のG418
耐性細胞とをいっしょに1日間培養し、ウイルスの滴
度を測定し、1.0⁶ CFU/ml以上の滴度を有するウ
イルスプロデュサー細胞 (組み換えベクターをインフ
ェクションしたGP+E-86細胞) を以下の実施例に用
いた。

【0027】実施例7 (ウイルス感染性若者リンパ球
の作製)
上記実施例6によって得られた単細胞の幼若リンパ球
母液を最終的に0.5×2×10⁶個/ウェルとなる
ように96フラットウェルに分注し、さらにあらかじめ
トリプシン処理し、1日間培養した上記ウイルスプロ
デュサー細胞を1ウェル当たり2～5×10⁵個加え
て、これらをウェル内で混合した。この混合物を、最
終濃度1～5 ng/mlのマウスの組織浸透性IL-7 (イン
ターロイキン7; Genzyme社製) と、又はこれと最
終濃度1～5 ng/mlの幹細胞因子 (SCF) の存在
下において1～2日間培養した。その後、共培養した幼
若リンパ球を静かにピペッティングしながら回収し
た。幼若リンパ球はプロデュサー細胞よりも少
く、密度が低いことを利用して、遺伝子が導入された
幼若リンパ球 (図2のa部分) をフォーワード&サイ
ドスクランナー (forward and side scatter) により分
離し (図2)、蛍光活性化セルソーターにより、生存能
力のある幼若リンパ球を分離・精製した。また、造血
細胞マーカーCD45に対する抗体を染色したものを使用
して、フローサイトメトリセルソーターでGFP⁺
CD45⁺細胞をソートすることにより、遺伝子が導入
された幼若リンパ球を、減毒芽細胞由来のウイルスプ
ロデュサー細胞から選択して分離・精製した。

【0028】実施例8 (遺伝子導入幼若リンパ球による
導入遺伝子の発現)
正常なマウス (B6) のTリンパ球を一過性に抑制する
ために低線量の放射線照射し、上記実施例7により得
られた遺伝子導入幼若リンパ球を胸腺へ直接注射する
ことにより胸腺に移入した。このマウスの放射線照射
からの回復を待ってから、pCD-GFPレトロウイルス

(7)

特開 2001-139496

11

を導入した脾細胞を腹腔内に注射し、2週間後、抗GFP抗体を酵素抗体法を用いて血中抗体価で測定した。また、コントロールとして抗BSA（仔牛血清アルブミン）抗体をも同様に測定した。結果を図3に示す。図3中、“No treatment”は無処理の正常なマウス（B6）における血中抗体価を意味し、治療のことなく抗体が生成しないことがわかる。“pGD-GFP ip”は、正常なマウス（B6）にpGD-GFPレトロウイルス導入脾細胞を腹腔内に注射したときの血中抗体価を意味し、GFPの発現により抗GFP抗体が生成していることが示されている。“pGD-GFP it”は、pGD-GFPレトロウイルス導入脾細胞を腹腔内に注射していない上記実施例7により得られた遺伝子導入幼若Tリンパ球胸腺移入マウス（B6）の血中抗体価を意味し、このマウスでは抗GFP抗体が殆ど生成しないことがわかる。“pGD-GFP it → pGD-GFP ip”は、上記実施例7により得られた遺伝子導入幼若Tリンパ球胸腺移入マウス（B6）に、pGD-GFPレトロウイルス導入脾細胞を腹腔内に注射したときの血中抗体価を意味し、このマウスにおいて抗GFP抗体が殆ど出現していないことがわかる。以上の結果から、上記実施例7により得られた遺伝子導入幼若Tリンパ球胸腺移入マウス（B6）において、ウイルスベクター由来のGFP成分に免疫寛容が成立したことを確認した。すなわち、抗ベクター免疫応答を回避させることができ、持続的な遺伝子治療が可能となることが

12

*わかった。またこのとき、ベクター成分以外の外来分子に対する免疫応答は正常に保たれており、マウスの免疫系全体が傷害を受けたわけではなく、遺伝子治療用のベクターに対しての特異的免疫寛容が誘導されたことも確認した。

【0029】

【発明の効果】本発明によると、外来遺伝子が組み込まれたベクター等の外来性DNAが導入された幼若Tリンパ球を胸腺に移入して、胸腺器官内で上記外来性DNAを発現させることにより当該外来性DNAやその発現産物に対して後天的免疫寛容を獲得させることができ、また、かかる外来性DNAやその発現産物に対する拒絶応答を回避させ、遺伝子治療の効果を長期間安定して持続して行うこともできる。さらに、本発明の外来遺伝子が組み込まれたベクター等の外来性DNAやその発現産物に対する後天的免疫寛容を獲得した非ヒト動物は、遺伝子治療等の研究開発に用いると極めて有用である。

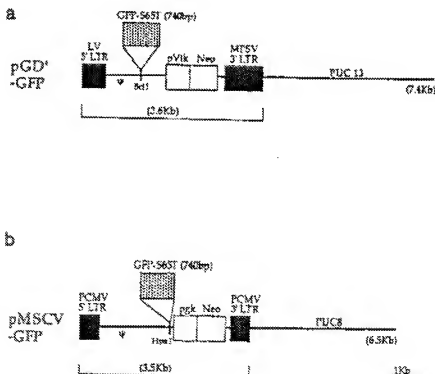
【図面の簡単な説明】

【図1】本発明における遺伝子導入に用いたベクターの構成を示す図である。

【図2】フォーワード&サイドスキャッターによる遺伝子導入幼若Tリンパ球とウイルスプロダクター細胞の分析結果を示す図である。

【図3】遺伝子導入幼若Tリンパ球胸腺移入マウスにおける免疫応答の結果を示す図である。

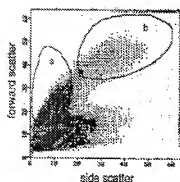
【図1】



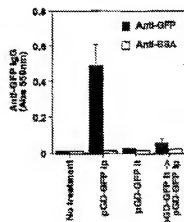
(8)

特開2001-139496

【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁷

識別記号

F I

チーコード (参考)

C 1 2 N 7/00

A 6 1 K 35/14

Z

16/00

35/24

// A 6 1 K 35/14

35/76

35/24

C 1 2 N 8/00

B

35/76

15/00

A

Fターム (参考) 4B024 AA61 BA60 CA02 DA02 EA02

GA11 GA18 HA17

4B06S AA90X AA92X AA95Y AA97Y

AP01 AC14 BA02 BD50 CA24

CA44

4C084 AA12 NA14 ZB022 ZC552

4C085 AA02

4C087 AA01 AA02 BB37 BD42 B66S

BC83 CA12 NA14 ZB02 ZC55